

Εγχειρίδιο ΚΙΤ *ipsogen*[®] BCR-ABL1 mbc



Έκδοση 1

IVD

Ποσοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με τα όργανα Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®],
LightCycler[®] και SmartCycler[®]



REF

670023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
Γερμανία

R2

MAT

1072506EL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

Η QIAGEN ηγείται στο χώρο πρωτοποριακών τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών, παρέχοντας τη δυνατότητα απομόνωσης και ανίχνευσης των περιεχομένων οποιουδήποτε βιολογικού δείγματος. Τα προηγμένα, υψηλής ποιότητας προϊόντα και οι υπηρεσίες μας αποτελούν εγγύηση επιτυχίας - από το δείγμα έως το αποτέλεσμα.

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

- στον καθαρισμό DNA, RNA και πρωτεϊνών
- στους προσδιορισμούς νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- στην έρευνα microRNA και RNAi
- στην αυτοματοποίηση τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση των δικών σας επιτυχιών και επιτευγμάτων.

Για περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε μας στη διεύθυνση

www.qiagen.com

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	4
Περίληψη και ερμηνεία	4
Αρχές της διαδικασίας	5
Υλικά που παρέχονται	8
Περιεχόμενα του κιτ	8
Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται	9
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	10
Γενικές προφυλάξεις	11
Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων	11
Διαδικασία	13
Προετοιμασία RNA δείγματος	13
Πρωτόκολλα	
■ Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC	13
■ qPCR σε όργανα Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ή RotorGene Q 5plex HRM με στροφέα 72 σωληναρίων	16
■ qPCR σε ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS και σε όργανο LightCycler 480	20
■ qPCR σε όργανα LightCycler 1.2 και 2.0	25
■ qPCR στο όργανο SmartCycler	29
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων	33
Αρχή της ανάλυσης δεδομένων	33
Αποτελέσματα	34
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	36
Ποιοτικός έλεγχος	40
Περιορισμοί	40
Χαρακτηριστικά απόδοσης	41
Μη κλινικές μελέτες	41
Κλινικές μελέτες	43
Βιβλιογραφία	46
Σύμβολα	47
Πληροφορίες επικοινωνίας	47
Πληροφορίες παραγγελίας	49

Προβλεπόμενη χρήση

Το kit *ipsogen* BCR-ABL1 *mbc*r προορίζεται για την ποσοτικοποίηση των μεταγραφημάτων BCR-ABL p190 σε δείγματα μυελού των οστών ή περιφερικού αίματος ασθενών με θετική στο Ph οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ, ALL) που έχουν προηγουμένως διαγνωστεί με ένα συμβάν γονιδίου σύντηξης BCR-ABL *mbc*r (FG). Τα λαμβανόμενα αποτελέσματα προορίζονται για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία, καθώς και για την παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD) για την παρακολούθηση της υποτροπής της νόσου.

Περίληψη και ερμηνεία

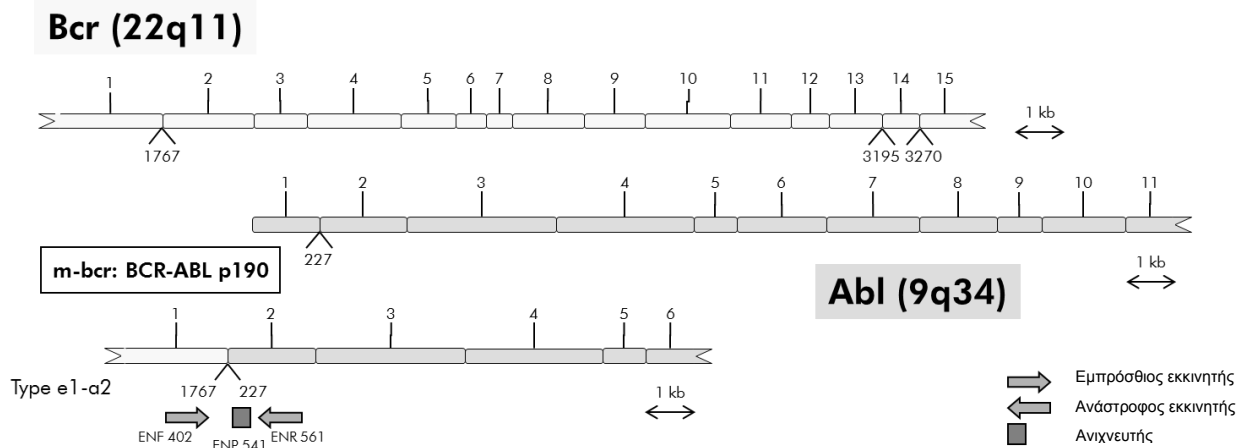
Το χρωμόσωμα Philadelphia (Ph) είναι η συχνότερη καρυοτυπική παρέκκλιση στους ενήλικες με ΟΛΛ. Παρατηρείται στο 20–30% των ενηλίκων ασθενών με ΟΛΛ συνολικά, με την επίπτωση να αυξάνεται σε πάνω από 50% στους ασθενείς ηλικίας 50 ετών και άνω.

Σε αυτήν τη μετάθεση, το 3' τμήμα του ABL πρωτοογκογονιδίου στο χρωμόσωμα 9 αντιπαρατίθεται με το 5' τμήμα του BCR γονιδίου στο χρωμόσωμα 22. Το BCR-ABL FG αποτελεί το προϊόν του χρωμοσώματος Ph και είναι μια ιδιοσυστατικά ενεργή πρωτεΐνη κινάσης της τυροσίνης.

Διακοπές στο γονίδιο ABL τυπικά παρατηρούνται στο πρώτο ιντρόνιο. Διακοπές στο γονίδιο BCR γενικά παρατηρούνται σε μία από τις ακόλουθες 3 περιοχές: μια περιοχή 5,8 kb που εκτείνεται στα εξόνια 12–16, που ονομάζεται η κύρια περιοχή συστάδας σημείων διακοπής (major breakpoint cluster region, *Mbc*r), μια αλληλουχία 55 kb του πρώτου ιντρονίου, που ονομάζεται η ελάσσων περιοχή συστάδας σημείων διακοπής (minor breakpoint cluster region, *mbc*r), και η μικρο-περιοχή συστάδας σημείων διακοπής (micro breakpoint cluster region, *μ-bc*r).

Σημεία διακοπής παρατηρούμενα στην *mbc*r ενώνουν το εξόνιο1 (e1) με το δεύτερο εξόνιο του γονιδίου ABL (a2), οδηγώντας σε ένα μικρότερο μεταγράφημα σύντηξης, e1a2, που κωδικοποιεί μια χιμαιρική πρωτεΐνη 190 kDa (p190) (Εικόνα 1). Η πρωτεΐνη p190 BCR-ABL παρατηρείται μόνο στην Ph+ ΟΛΛ, ενώ η πρωτεΐνη p210 BCR-ABL είναι συνήθης στο 20–40% των ασθενών με Ph+ ΟΛΛ και σε όλους σχεδόν τους ασθενείς με Ph+ χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ).

Όλες οι μορφές των πρωτεϊνών σύντηξης BCR-ABL εμφανίζουν αυξημένη και απορρυθμισμένη δραστηριότητα της κινάσης της τυροσίνης, ενώ η μορφή p190 έχει καταδειχθεί ότι διαθέτει περισσότερο δυναμικό μετασχηματισμού από ό,τι η p210. Επιπλέον, αυτή η χιμαιρική πρωτεΐνη φαίνεται ότι απορρυθμίζει τις φυσιολογικές, εξαρτώμενες από κυτοκίνες οδούς μεταγωγής σημάτων, οδηγώντας στην αναστολή της απόπτωσης ή στην ανεξάρτητη από αυξητικό παράγοντα αύξηση.



Εικόνα 1. Σχηματικό διάγραμμα του μεταγραφήματος BCR-ABL mbcr FG που καλύπτεται από τους εκκινητές και σύνολο ανιχνευτών qPCR: ENF402–ENP541–ENR561. Ο αριθμός κάτω από τους εκκινητές και τον ανιχνευτή αναφέρεται στη θέση του νουκλεοτιδίου τους στο μεταγράφημα του φυσιολογικού γονιδίου.

Η θεραπεία των ασθενών με Ph⁺ ΟΛΛ έχει βελτιστοποιηθεί με την εισαγωγή αναστολέων κινάσης της τυροσίνης, βελτιώνοντας σημαντικά την επιβίωση αυτών των ασθενών (για μια επισκόπηση, βλ. παραπομπή 1). Για τους ασθενείς αυτούς, απαιτείται παρακολούθηση της MRD. Η τρέχουσα μεθοδολογία για τη μέτρηση του επιπέδου MRD περιλαμβάνει τη χρήση ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR) πραγματικού χρόνου, μέσω της οποίας τα μέλη της μεταγραφής BCR-ABL σχετίζονται με τους αριθμούς μεταταγραφημάτων ενός γονιδίου μάρτυρα. Το kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr βασίζεται σε αυτήν την τεχνική.

Αρχές της διαδικασίας

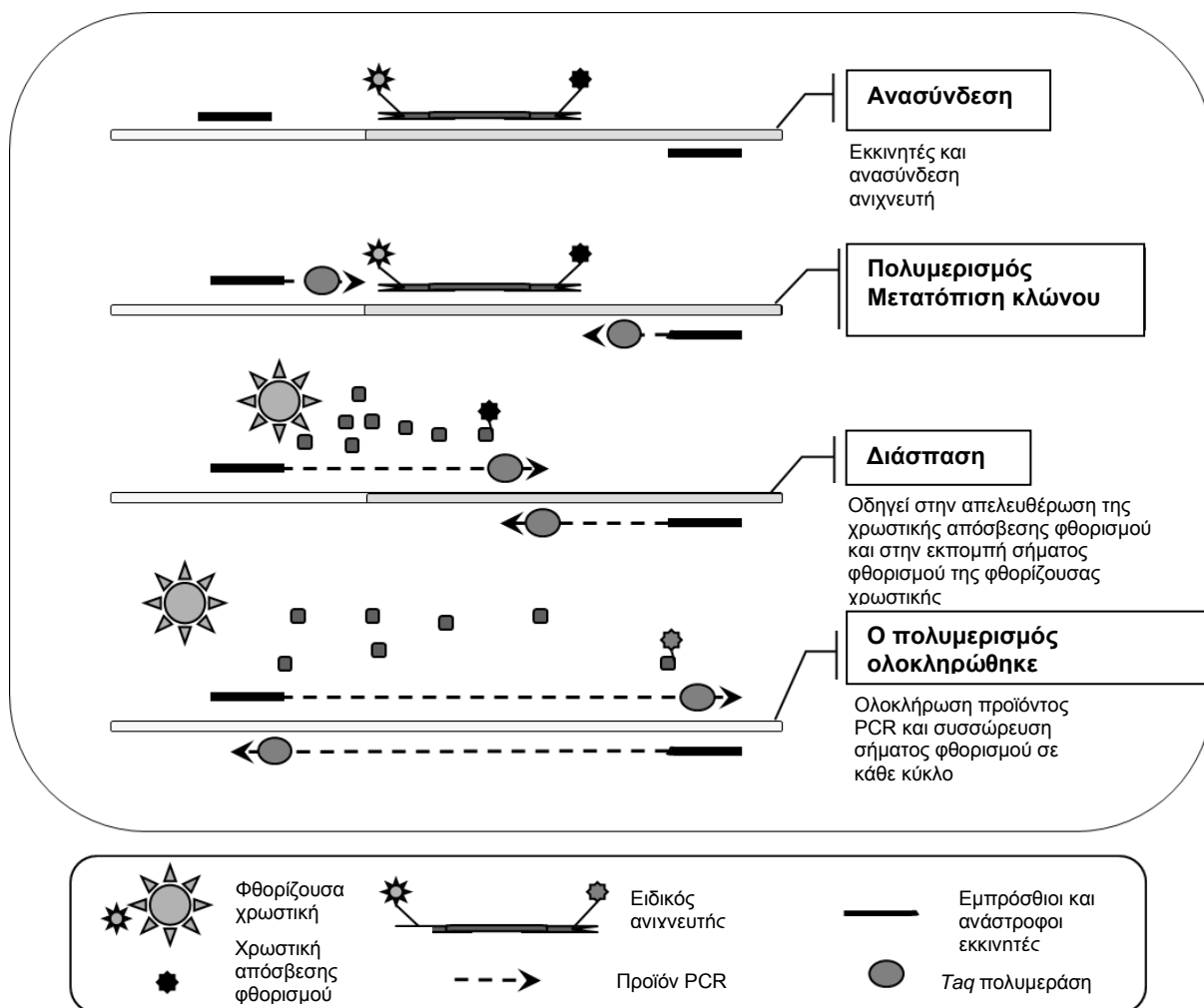
Η qPCR επιτρέπει την ακριβή ποσοτικοποίηση των προϊόντων PCR κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της διεργασίας ενίσχυσης PCR. Τα ποσοτικά δεδομένα PCR μπορούν να ληφθούν γρήγορα, χωρίς μετεπεξεργασία PCR, μέσω ανίχνευσης σε πραγματικό χρόνο των σημάτων φθορισμού κατά τη διάρκεια ή/και μετά την κυκλοποίηση PCR, μειώνοντας έτσι δραστικά τον κίνδυνο επιμόλυνσης του προϊόντος PCR. Επί του παρόντος, υπάρχουν διαθέσιμοι 3 κύριοι τύποι τεχνικών qPCR: Ανάλυση qPCR που χρησιμοποιεί χρωστική SYBR[®] Green I, ανάλυση qPCR που χρησιμοποιεί ανιχνευτές υδρόλυσης, και ανάλυση qPCR που χρησιμοποιεί ανιχνευτές υβριδισμού.

Αυτός ο προσδιορισμός εκμεταλλεύεται την αρχή της ολιγονουκλεοτιδικής υδρόλυσης διπλής χρωστικής qPCR. Κατά τη διάρκεια της PCR, εμπρόσθιοι ή ανάστροφοι εκκινητές υβριδίζουν σε μια ειδική αλληλουχία. Ένα νουκλεοτίδιο διπλής χρώσης περιέχεται στο ίδιο μείγμα. Αυτός ο ανιχνευτής, ο οποίος αποτελείται από ένα ολιγονουκλεοτίδιο σημασμένο με μια φθορίζουσα χρωστική (reporter) στο 5' άκρο του και μια καθοδική χρωστική απόσβεσης φθορισμού (quencher) στο 3' άκρο του, υβριδίζει σε μια αλληλουχία-στόχο εντός του προϊόντος PCR. Η ανάλυση qPCR με τους ανιχνευτές υδρόλυσης εκμεταλλεύεται τη δραστηριότητα 5'→3' εξονουκλεάσης της DNA πολυμεράσης

από *Thermus aquaticus* (*Taq*). Όταν ο ανιχνευτής είναι άθικτος, η εγγύτητα της φθορίζουσας χρωστικής με τη χρωστική απόσβεσης φθορισμού οδηγεί σε καταστολή του φθορισμού της φθορίζουσας χρωστικής κυρίως μέσω μεταφοράς ενέργειας τύπου Förster.

Κατά τη διάρκεια της PCR, εάν ο στόχος ενδιαφέροντος είναι παρών, ο ανιχνευτής ανασυνδέεται ειδικά μεταξύ των θέσεων εμπρόσθιων και ανάστροφων εκκινήτων. Η δραστηριότητα 5'→3' εξονουκλεάσης της DNA πολυμεράσης διασπά τον ανιχνευτή μεταξύ της φθορίζουσας χρωστικής και της χρωστικής απόσβεσης φθορισμού μόνο εάν ο ανιχνευτής υβριδίζει στο στόχο. Τα θραύσματα του ανιχνευτή στη συνέχεια μετατοπίζονται από το στόχο, και ο πολυμερισμός του κλώνου συνεχίζεται. Το 3' άκρο του ανιχνευτή μπλοκάρεται για να αποτραπεί η επέκταση του ανιχνευτή κατά τη διάρκεια της PCR (Εικόνα 2). Αυτή η διεργασία λαμβάνει χώρα σε κάθε κύκλο και δεν παρεμβαίνει στην εκθετική συσσώρευση του προϊόντος.

Η αύξηση του σήματος φθορισμού ανιχνεύεται μόνο εάν η αλληλουχία-στόχος είναι συμπληρωματική στον ανιχνευτή και ως εκ τούτου ενισχύεται κατά τη διάρκεια της PCR. Λόγω αυτών των απαιτήσεων, δεν ανιχνεύεται μη ειδική ενίσχυση. Συνεπώς, η αύξηση του φθορισμού είναι ευθέως ανάλογη με την ενίσχυση του στόχου κατά τη διάρκεια της PCR.



Εικόνα 2. Γενική αρχή της αντίδρασης. Το ολικό RNA μεταγράφεται αντίστροφα και το παραγόμενο cDNA ενισχύεται μέσω της PCR χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος ειδικών εκκινητών και έναν ειδικό εσωτερικό ανιχνευτή διπλής χρώσης (FAM™–TAMRA™). Ο ανιχνευτής συνδέεται στο αμπλικόνιο κατά τη διάρκεια κάθε βήματος ανασύνδεσης της PCR. Όταν η Taq DNA πολυμεράση επεκτείνεται από τον εκκινητή που είναι συνδεδεμένος στο αμπλικόνιο, μετατοπίζει το 5' άκρο του ανιχνευτή, το οποίο στη συνέχεια αποικοδομείται από τη δραστηριότητα της 5'→3' εξωνουκλεάσης της Taq DNA πολυμεράσης. Η διάσπαση συνεχίζεται μέχρι την τήξη του αμπλικονίου από τον υπολειπόμενο ανιχνευτή. Αυτή η διεργασία απελευθερώνει το φθορισμοφόρο και τη χρωστική απόσβεσης φθορισμού, διαχωρίζοντάς τα στο χώρο και οδηγώντας σε μια αύξηση του φθορισμού από το FAM και μια μείωση του φθορισμού από το TAMRA.

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του ΚΙΤ

<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbcrl Kit		(24)
Αρ. καταλόγου		670023
Αριθμός αντιδράσεων		24
ABL Control Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου-μάρτυρα ABL) (10^3 αντίγραφα/5 μ l)	C1-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου-μάρτυρα ABL) (10^4 αντίγραφα/5 μ l)	C2-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου-μάρτυρα ABL) (10^5 αντίγραφα/5 μ l)	C3-ABL	50 μ l
BCR-ABL mbcrl Fusion Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου σύντηξης BCR-ABL mbcrl) (10^1 αντίγραφα/5 μ l)	F1-BCR-ABL e1a2 mbcrl	50 μ l
BCR-ABL mbcrl Fusion Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου σύντηξης BCR-ABL mbcrl) (10^2 αντίγραφα/5 μ l)	F2-BCR-ABL e1a2 mbcrl	50 μ l
BCR-ABL mbcrl Fusion Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου σύντηξης BCR-ABL mbcrl) (10^3 αντίγραφα/5 μ l)	F3-BCR-ABL e1a2 mbcrl	50 μ l
BCR-ABL mbcrl Fusion Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου σύντηξης BCR-ABL mbcrl) (10^5 αντίγραφα/5 μ l)	F4-BCR-ABL e1a2 mbcrl	50 μ l
BCR-ABL mbcrl Fusion Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου σύντηξης BCR-ABL mbcrl) (10^6 αντίγραφα/5 μ l)	F5-BCR-ABL e1a2 mbcrl	50 μ l
Primers and Probe Mix ABL (εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών ABL)*	PPC-ABL 25x	90 μ l

*Μείγμα ειδικών αναστροφών και εμπρόσθιων εκκινητών για το γονίδιο-μάρτυρα ABL συν ειδικός ανιχνευτής FAM-TAMRA.

Primers and Probe Mix BCR-ABL mbc _r Fusion Gene (εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών γονιδίου σύντηξης BCR-ABL mbc _r) [†]	PPF-mbc _r 25x	110 μl
ipsogen <i>BCR-ABL1 mbc_r Kit Handbook</i> (αγγλικά)		1

[†] Μείγμα ειδικών ανάστροφων και εμπρόσθιων εκκινητών για το γονίδιο σύντηξης BCR-ABL mbc_r συν ειδικός ανιχνευτής FAM-TAMRA.

Σημείωση: Φυγοκεντρίστε σύντομα τα πρότυπα αραιωμένα διαλύματα και τους εκκινητές και τα μείγματα ανιχνευτών πριν τη χρήση.

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS), τα οποία και είναι διαθέσιμα από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Αντιδραστήρια

- Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση
- Αντιδραστήρια για ανάστροφη μεταγραφή: Το επικυρωμένο αντιδραστήριο είναι Superscript[®] II (ή Superscript) Reverse Transcriptase (ανάστροφη μεταγραφή), περιλαμβάνει 5x ρυθμιστικό διάλυμα πρώτου κλώνου, 100 mM DTT (Life Technologies, αριθμός καταλόγου 18064-022)
- Αναστολέας RNασών: Το επικυρωμένο αντιδραστήριο είναι RNaseOUT[™] (Life Technologies, αρ. καταλόγου 10777-019)
- Σετ dNTP, κατηγορίας εφαρμογών PCR
- Τυχαίο εξαμερές
- MgCl₂
- Ρυθμιστικό διάλυμα και Taq DNA πολυμεράση: Τα επικυρωμένα αντιδραστήρια είναι TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (κύριο μείγμα PCR 2x) (Life Technologies, αρ. καταλόγου 4304437) και LightCycler TaqMan Master (κύριο μείγμα PCR 5x) (Roche, αρ. καταλόγου 04535286001)

Αναλώσιμα

- Ανθεκτικά στα αερολύματα αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας PCR χωρίς νουκλεάση με υδρόφοβα φίλτρα
- Σωληνάρια PCR χωρίς RNάση και DNάση 0,5 ml ή 0,2 ml
- Πάγος

Εξοπλισμός

- Πιπέτα μικρολίτρων* αποκλειστική για PCR (1–10 µl, 10–100 µl, 100–1.000 µl)
- Φυγόκεντρος πάγκου* με στροφέα για σωληνάρια αντίδρασης 0,2 ml/0,5 ml (με δυνατότητα επίτευξης 10.000 rpm)
- Όργανο PCR πραγματικού χρόνου:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ή άλλο όργανο Rotor Gene, LightCycler 1.2, 2.0 ή 480, ABI PRISM 7000, 7700 ή 7900HT SDS, ή όργανο SmartCycler, και σχετικό ειδικό υλικό
- Θερμικός κυκλοποιητής* ή λουτρό νερού* (βήμα ανάστροφης μεταγραφής)

Συμπληρωματικά αντιδραστήρια

- Κιτ μαρτύρων *ipsogen* BCR-ABL1 mbcf (αρ. καταλόγου 670091), που αποτελείται από κυτταρικές σειρές με αρνητική, υψηλή και χαμηλή θετική έκφραση του γονιδίου σύντηξης BCR-ABL mbcf για την ποσοτική επικύρωση της εκχύλισης RNA και της ανάστροφης μεταγραφής

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για διαγνωστική χρήση in vitro

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες παρακαλείστε να ανατρέξετε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS). Αυτά τα δελτία είναι διαθέσιμα online σε εύχρηστη μορφή PDF στη διεύθυνση www.qiagen.com/safety όπου και μπορείτε να βρείτε, να προβάλλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε κιτ και συστατικό των κιτ της QIAGEN.

Απορρίψτε τα απόβλητα δειγμάτων και προσδιορισμών σύμφωνα με τις εκάστοτε τοπικές διατάξεις ασφαλείας.

* Βεβαιωθείτε πως τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

Γενικές προφυλάξεις

Η χρήση δοκιμασιών qPCR απαιτεί καλές εργαστηριακές πρακτικές, συμπεριλαμβανομένης της συντήρησης του εξοπλισμού, οι οποίες είναι αποκλειστικές για τη μοριακή βιολογία, και πρέπει να συμμορφώνεται με τους ισχύοντες κανονισμούς και τα σχετικά πρότυπα.

Αυτό το kit προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση. Τα αντιδραστήρια και οι οδηγίες που παρέχονται σε αυτό το kit έχουν επικυρωθεί για βέλτιστη απόδοση. Η περαιτέρω αραίωση των αντιδραστηρίων ή η αλλαγή των χρόνων και θερμοκρασιών επώασης ενδέχεται να οδηγήσει σε εσφαλμένα ή ασύμβατα δεδομένα. Τα αντιδραστήρια PPC και PPF μπορεί να αλλοιωθούν εάν εκτεθούν στο φως. Όλα τα αντιδραστήρια είναι μορφοποιημένα ειδικά για χρήση με αυτήν τη δοκιμασία. Για βέλτιστη απόδοση της δοκιμασίας, δεν επιτρέπεται να γίνουν υποκαταστάσεις.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων μεταγραφημάτων με χρήση qPCR απαιτεί τόσο την ανάστροφη μεταγραφή του mRNA όσο και την ενίσχυση του παραγόμενου cDNA μέσω PCR. Συνεπώς, ολόκληρη η διαδικασία του προσδιορισμού πρέπει να εκτελείται υπό συνθήκες ελεύθερες από RNάση/DNάση.

Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφευχθεί:

- Επιμόλυνση RNάσης/DNάσης, η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει αποικοδόμηση της μήτρας mRNA και του παραγόμενου cDNA
- Επιμόλυνση από μεταφορά mRNA ή PCR με αποτέλεσμα ψευδές θετικό σήμα

Συνεπώς, συνιστούμε τα ακόλουθα.

- Χρησιμοποιείτε εργαστηριακό εξοπλισμό (π.χ. πιπέτες, ρύγχη πιπέτας, φιαλίδια αντίδρασης) ελεύθερο νουκλεάσης και φοράτε γάντια όταν εκτελείτε τον προσδιορισμό.
- Χρησιμοποιείτε νέα ανθεκτικά στα αερολύματα ρύγχη πιπέτων για όλα τα βήματα διανομής με πιπέτα προκειμένου να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων.
- Παρασκευάζετε το κύριο προ-μείγμα PCR με αποκλειστικά για το σκοπό αυτό υλικά (πιπέτες, ρύγχη κτλ.) σε αποκλειστικό χώρο όπου δεν έχουν εισαχθεί μήτρες DNA (cDNA, DNA, πλασμίδιο). Προσθέτετε τη μήτρα σε ξεχωριστή ζώνη (κατά προτίμηση σε ξεχωριστό δωμάτιο) με ειδικά υλικά (πιπέτες, ρύγχη κτλ.).
- Χειρίζετε τα πρότυπα αραιωμένα διαλύματα (C1–3 και F1–5) σε ξεχωριστό δωμάτιο.

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Τα kit αποστέλλονται σε ξηρό πάγο και πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία -30°C έως -15°C κατά την παραλαβή.

- Ελαχιστοποιήστε την έκθεση των εκκινητών και μειγμάτων ανιχνευτών στο φως (σωληνάρια PPC και PPF).
- Αναμείξτε απαλά και φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια πριν το άνοιγμα.
- Φυλάσσετε όλα τα συστατικά του κιτ στους αρχικούς περιέκτες.

Αυτές οι συνθήκες φύλαξης ισχύουν τόσο για τα ανοιγμένα όσο και τα μη ανοιγμένα συστατικά. Συστατικά που φυλάσσονται σε συνθήκες διαφορετικές από εκείνες που αναφέρονται στις ετικέτες ενδέχεται να μην έχουν σωστή απόδοση και να επηρεάσουν αρνητικά τα αποτελέσματα του προσδιορισμού.

Οι ημερομηνίες λήξης για κάθε αντιδραστήριο υποδεικνύονται στις ετικέτες των επιμέρους συστατικών. Σε σωστές συνθήκες φύλαξης, το προϊόν θα διατηρήσει την απόδοσή του μέχρι την ημερομηνία λήξης που είναι τυπωμένη στην ετικέτα.

Δεν υπάρχουν εμφανή σημάδια που να υποδεικνύουν τυχόν αστάθεια αυτού του προϊόντος. Εντούτοις, θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να εκτελούνται ταυτόχρονα με άγνωστα δείγματα.

Διαδικασία

Προετοιμασία RNA δείγματος

Η προετοιμασία RNA από δείγματα ασθενούς (αίμα ή μυελός των οστών) πρέπει να έχει διενεργηθεί με επικυρωμένη διαδικασία. Η ποιότητα του προσδιορισμού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα του RNA εισόδου. Συνεπώς συνιστούμε την επικύρωση του κεκαθαμένου RNA μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης* ή χρησιμοποιώντας το βιοαναλυτή Agilent® Bioanalyzer® πριν από την ανάλυση.

Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Προετοιμάστε dNTP, 10 mM έκαστο. Φυλάξτε στους -20°C σε κλάσματα.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Επωάστε 1 μg RNA (1–4 μl) για 10 λεπτά στους 70°C και ψύξτε αμέσως σε πάγο για 5 λεπτά.
3. Φυγοκεντρίστε σύντομα (περίπου 10 δευτερόλεπτα, 10.000 rpm, για να συλλέξετε το υγρό στο κάτω μέρος του σωληναρίου). Στη συνέχεια διατηρήστε σε πάγο.
4. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα RT σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία (Πίνακας 1).

* Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά.

Πίνακας 1. Προετοιμασία του μείγματος RT

Συστατικό	Όγκος ανά δείγμα (μl)	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα πρώτου κλώνου (παρέχεται με την ανάστροφη μεταγραφάση Superscript II), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP (10 mM έκαστο, να προετοιμάζεται προηγουμένως και να φυλάσσεται στους –20°C σε κλάσματα)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, παρέχεται με την ανάστροφη μεταγραφάση Superscript II)	2,0	10 mM
Αναστολέας RNασών (40 U/μl)	0,5	1 U/μl
Τυχαίο εξαμερές (100 μM)	5,0	25 μM
Ανάστροφη μεταγραφάση Superscript II ή Superscript (200 U/μl)	0,5	5 U/μl
Θερμασμένο δείγμα RNA (για προσθήκη στο βήμα 5)	1,0–4,0	50 ng/μl
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση (για προσθήκη στο βήμα 5)	0,0–3,0	–
Τελικός όγκος	20,0	–

5. Διανείμετε με πιπέτα 16 μl του μείγματος RT σε κάθε σωληνάριο PCR. Στη συνέχεια προσθέστε 1–4 μl (1 μg) RNA (από το βήμα 3), και προσαρμόστε τον όγκο σε 20 μl με νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση (βλ. Πίνακα 2).

Πίνακας 2. Προετοιμασία της αντίδρασης ανάστροφης μεταγραφής

Συστατικό	Όγκος (μl)
Μείγμα RT	16
Θερμασμένο RNA δείγματος (1 μg)	1–4
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	0–3
Τελικός όγκος	20

6. Αναμείξτε καλά και φυγοκεντρίστε σύντομα (περίπου 10 δευτερόλεπτα, 10.000 rpm, για να συλλέξετε το υγρό στο κάτω μέρος του σωληναρίου).
7. Επωάστε στους 20°C για 10 λεπτά.
8. Επωάστε στους 42°C σε θερμικό κυκλοποιητή για 45 λεπτά, κατόπιν αμέσως στους 99°C για 3 λεπτά.
9. Ψύξτε σε πάγο (για να διακόψετε την αντίδραση) για 5 λεπτά.
10. Φυγοκεντρίστε σύντομα (περίπου 10 δευτερόλεπτα, 10.000 rpm, για να συλλέξετε το υγρό στο κάτω μέρος του σωληναρίου). Στη συνέχεια διατηρήστε σε πάγο.
11. Αραιώστε το τελικό cDNA με 30 μl νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 50 μl.
12. Διενεργήστε PCR σύμφωνα με τα ακόλουθα πρωτόκολλα, σύμφωνα με το όργανο qPCR που διαθέτετε.

Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανα Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ή RotorGene Q 5plex HRM με στροφέα 72 σωληναρίων

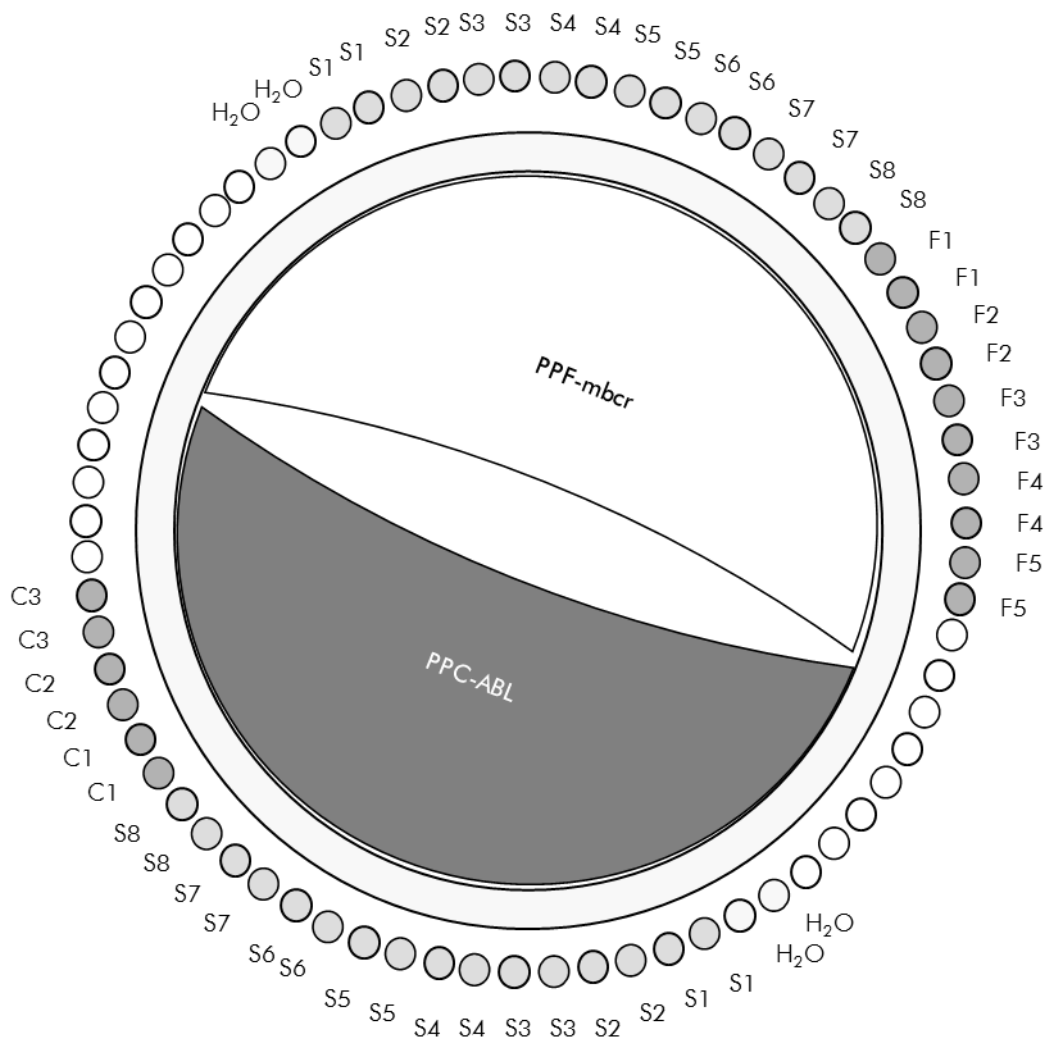
Κατά τη χρήση αυτού του οργάνου, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Αριθμός αντιδράσεων για όργανα Rotor-Gene Q με στροφέα 72 σωληναρίων

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών ABL (PPC-ABL)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	2 x 3 αντιδράσεις (3 αραιώσεις, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο mbcr	2 x 5 αντιδράσεις (5 αραιώσεις, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις

Επεξεργασία δειγμάτων σε όργανα Rotor-Gene Q με στροφέα 72 σωληναρίων

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 8 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ανιχνευτών.



Εικόνα 3. Προτεινόμενη προετοιμασία στροφέα για κάθε πείραμα με το κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 mbc. F1–5: πρότυπα BCR-ABL mbc, C1–3: πρότυπα ABL, S: δείγμα cDNA, H₂O: μάρτυρας νερού.

Σημείωση: Φροντίστε έτσι ώστε να τοποθετείτε πάντοτε ένα δείγμα προς εξέταση στη θέση 1 του στροφέα. Διαφορετικά, κατά τη διάρκεια του βήματος βαθμονόμησης, το όργανο δεν θα εκτελέσει βαθμονόμηση, και θα ληφθούν εσφαλμένα δεδομένα φθορισμού.

Γεμίστε όλες τις άλλες θέσεις με κενά σωληνάρια.

qPCR σε όργανα Rotor-Gene Q με στροφέα 72 σωληναρίων

Σημείωση: Εκτελέστε όλα βήματα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποφύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 4 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τον ίδιο εκκινητή και μείγμα ανιχνευτών (είτε PPC-ABL είτε PPF-mbcr). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 4. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 24+1 αντιδράσεις (μl)	BCR-ABL mbcr: 28+1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών, 25x	1	25	29	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6,5	162,5	188,5	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	25 έκαστο	–

- Χορηγήστε 20 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά σωληνάριο.
- Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC», σελίδα 13) στο αντίστοιχο σωληνάριο (συνολικός όγκος 25 μl).

5. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
6. Τοποθετήστε τα σωληνάρια στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
7. Προγραμματίστε το όργανο Rotor-Gene Q με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Προφίλ θερμοκρασίας

Λειτουργία ανάλυσης	Ποσοτικοποίηση
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 50 βαθμοί Χρόνος: 2 λεπτά
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95 βαθμοί Χρόνος: 10 λεπτά
Κυκλοποίηση	50 φορές 95 βαθμοί για 15 δευτερόλεπτα 60°C για 1 λεπτό με λήψη φθορισμού FAM στο κανάλι Green: Μονό

8. Για όργανα Rotor-Gene Q, επιλέξτε «Slope Correct» (διόρθωση κλίσης) για την ανάλυση. Συνιστούμε τη ρύθμιση του κατωφλίου στο 0,03. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 5.

Πρωτόκολλο: qPCR σε ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS και σε όργανο LightCycler 480

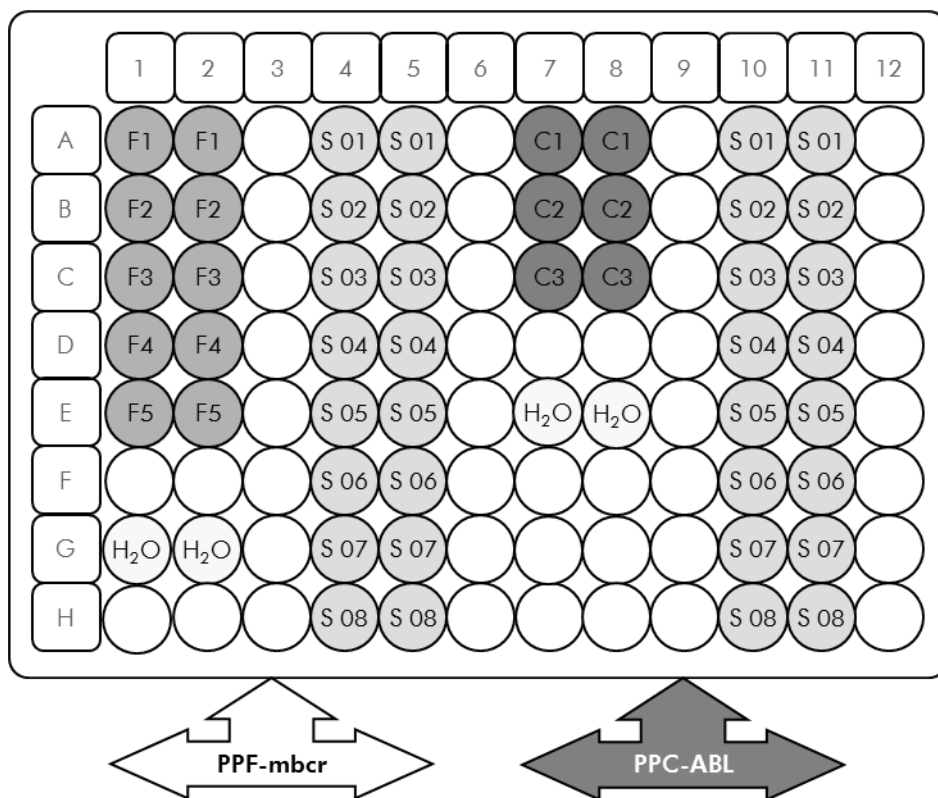
Κατά τη χρήση εξοπλισμού qPCR πλακιδίων 96 φρεατίων, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Αριθμός αντιδράσεων με χρήση εξοπλισμού qPCR πλακιδίων 96 φρεατίων

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών ABL (PPC-ABL)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	2 x 3 αντιδράσεις (3 αραιώσεις, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο mbcr	2 x 5 αντιδράσεις (5 αραιώσεις, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις

Επεξεργασία δείγματος σε ABI PRISM 7000, 7700 και 7900 SDS και σε όργανο LightCycler 480

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 8 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ανιχνευτών. Η διάταξη πλακιδίων στην Εικόνα 4 δείχνει ένα παράδειγμα τέτοιου πειράματος.



Εικόνα 4. Προτεινόμενη προετοιμασία πλακιδίων για ένα πείραμα. S: δείγμα cDNA, **F1–5:** πρότυπα BCR-ABL mbcr, **C1–3:** πρότυπα ABL, **H₂O:** μάρτυρας νερού.

qPCR σε ABI PRISM 7000, 7700 και 7900 SDS και σε όργανο LightCycler 480

Σημείωση: Εκτελέστε όλα βήματα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποφύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία. Εάν χρησιμοποιείτε εξοπλισμό qPCR πλακιδίων 96 φρεατίων, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 7 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τον ίδιο εκκινητή και μείγμα ανιχνευτών (είτε PPC-ABL είτε PPF-mbcr). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 7. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 24+1 αντιδράσεις (μl)	BCR-ABL mbcr: 28+1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών, 25x	1	25	29	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6,5	162,5	188,5	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	25 έκαστο	–

- Χορηγήστε 20 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά φρεάτιο.
- Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά **EAC**», σελίδα 13) στο αντίστοιχο φρεάτιο (συνολικός όγκος 25 μl).
- Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
- Κλείστε το πλακίδιο και φυγοκεντρίστε σύντομα (300 x g, περίπου 10 δευτερόλεπτα).
- Τοποθετήστε το πλακίδιο στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Προγραμματίστε τον θερμικό κυκλοποιητή με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 8 για ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS, ή στον Πίνακα 9 για το όργανο LightCycler 480.

Πίνακας 8. Προφίλ θερμοκρασίας για ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS

Λειτουργία ανάλυσης	Πρότυπη καμπύλη — Απόλυτη ποσοτικοποίηση
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 15 δευτερόλεπτα 60°C για 1 λεπτό με λήψη φθορισμού FAM, χρωστική απόσβεσης φθορισμού: TAMRA

Πίνακας 9. Προφίλ θερμοκρασίας για το όργανο LightCycler 480

Λειτουργία ανάλυσης	Απόλυτη ποσοτικοποίηση («Abs Quant»)
Μορφές ανίχνευσης	Επιλέξτε «Simple Probe» (απλός ανιχνευτής) στο παράθυρο Detection formats (μορφές ανίχνευσης)
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 15 δευτερόλεπτα 60°C για 1 λεπτό με λήψη φθορισμού FAM που αντιστοιχεί σε (483–533 nm) για LC έκδοση 01 και (465–510 nm) για LC έκδοση 02

8. Για ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS, ακολουθήστε το βήμα 8α. Για το όργανο LightCycler 480, ακολουθήστε το βήμα 8β.

8α. ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS: Συνιστούμε ένα κατώφλι ρυθμισμένο στο 0,1 όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο EAC στο βήμα ανάλυσης στο ABI PRISM SDS και γραμμή βάσης ρυθμισμένη μεταξύ των κύκλων 3 και 15. Ξεκινήστε το πρόγραμμα κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 8.

8β. Όργανο LightCycler 480: Συνιστούμε μια λειτουργία ανάλυσης Fit point (σημεία προσαρμογής) με υπόβαθρο 2,0 και κατώφλι στα 2,0. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 9.

Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανα LightCycler 1.2 και 2.0

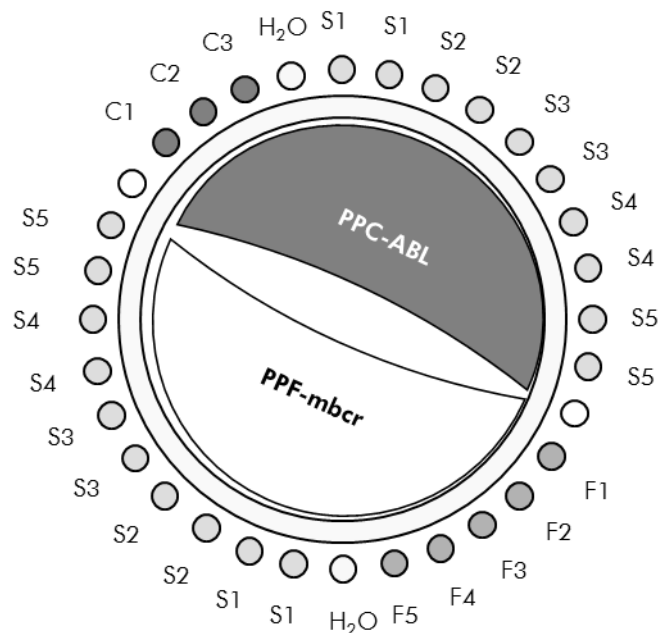
Κατά τη χρήση τριχοειδικών οργάνων, συνιστούμε τη μέτρηση των δειγμάτων εις διπλούν και των μαρτύρων μόνο εις απλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Αριθμός αντιδράσεων για τα όργανα LightCycler 1.2 και 2.0

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών ABL (PPC-ABL)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	1 x 3 αντιδράσεις (3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έναστο εξεταζόμενο εις απλούν)
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο mbcr	1 x 5 αντιδράσεις (5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έναστο εξεταζόμενο εις απλούν)
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση

Επεξεργασία δείγματος στα όργανα LightCycler 1.2 και 2.0

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 5 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ανιχνευτών. Το τριχοειδικό σχήμα στην Εικόνα 5 δείχνει ένα παράδειγμα πειράματος.



Εικόνα 5. Προτεινόμενη προετοιμασία στροφέα για κάθε πείραμα με το κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr. F1–5: πρότυπα BCR-ABL mbcr, C1–3: πρότυπα ABL, S: άγνωστο δείγμα DNA προς ανάλυση, H₂O: μάρτυρας νερού.

qPCR σε όργανα LightCycler 1.2 και 2.0

Σημείωση: Λόγω ιδιαίτερων τεχνολογικών απαιτήσεων, τα πειράματα στο LightCycler πρέπει να πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας ειδικά αντιδραστήρια. Συνιστούμε τη χρήση του LightCycler TaqMan Master και την τήρηση των οδηγιών του κατασκευαστή για την προετοιμασία του κύριου μείγματος 5x.

Σημείωση: Εκτελέστε όλα βήματα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 11 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 20 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών (είτε PPC-ABL είτε PPF-mbcr). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 11. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 14+1 αντιδράσεις (μl)	BCR- ABL mbcr: 16+1 αντι- δράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Φρέσκο προετοιμασμένο κύριο μείγμα LightCycler TaqMan, 5x	4,0	60	68,0	1x
Εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών, 25x	0,8	12	13,6	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	10,2	153	173,4	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5,0	5 έκαστο	5,0 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	20,0	20 έκαστο	20,0 έκαστο	–

- Χορηγήστε 15 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά τριχοειδές.
- Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά **EAC**», σελίδα 13) στο αντίστοιχο σωληνάριο (συνολικός όγκος 20 μl).
- Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
- Τοποθετήστε τα τριχοειδή στους προσαρμογείς που παρέχονται με τη συσκευή, φυγοκεντρίστε σύντομα (700 x g, περίπου 10 δευτερόλεπτα).
- Φορτώστε τα τριχοειδή στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

8. Προγραμματίστε το όργανο LightCycler 1.2 ή 2.0 με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Προφίλ θερμοκρασίας

Λειτουργία ανάλυσης	Ποσοτικοποίηση
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά Ράμπα: 20
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 10 δευτερόλεπτα, ράμπα: 20 60°C για 1 λεπτό, ράμπα: 20, με λήψη φθορισμού FAM: Μονό
Διατήρηση 2	45°C για 1 λεπτό, ράμπα: 20

9. Για το LightCycler 1.2, ακολουθήστε το βήμα 9α. Για το LightCycler 2.0, ακολουθήστε το βήμα 9β.
- 9α. LightCycler 1.2: Συνιστάται η λειτουργία F1/F2 και «2nd derivative analysis» (ανάλυση 2ης παραγώγου). Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 12.
- 9β. LightCycler 2.0: Συνιστούμε τη χρήση αυτοματοποιημένης (F''max) ανάλυσης στο LightCycler 2.0 έκδοση λογισμικού 4.0 για τη λήψη αναπαραγωγίμων αποτελεσμάτων. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 12.

Πρωτόκολλο: qPCR στο όργανο SmartCycler

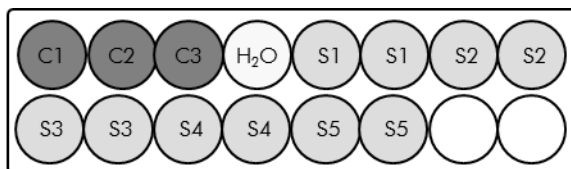
Κατά τη χρήση αυτού του οργάνου, συνιστούμε τη μέτρηση των δειγμάτων εις διπλούν και των μαρτύρων μόνο εις απλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13. Αριθμός αντιδράσεων για το όργανο SmartCycler

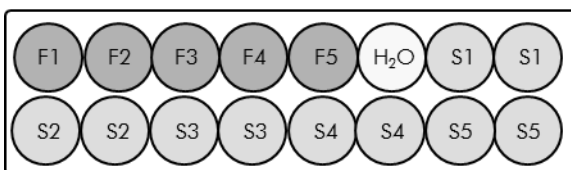
Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών ABL (PPC-ABL)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	1 x 3 αντιδράσεις (3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έναστο εξεταζόμενο εις απλούν)
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο mbcr	1 x 5 αντιδράσεις (5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έναστο εξεταζόμενο εις απλούν)
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση

Επεξεργασία δείγματος στο όργανο SmartCycler

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 5 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ανιχνευτών. Η διάταξη δύο μπλοκ στην Εικόνα 6 δείχνει ένα παράδειγμα.



Όλοι οι προσδιορισμοί σε αυτό το δεύτερο μπλοκ πραγματοποιούνται με PPC-ABL.



Όλοι οι προσδιορισμοί σε αυτό το δεύτερο μπλοκ πραγματοποιούνται με PPF-mbcr.

Εικόνα 6. Προτεινόμενη προετοιμασία πλακιδίων για ένα πείραμα. S: δείγμα cDNA, F1–5: πρότυπα BCR-ABL mbcr, C1–3: πρότυπα ABL, H₂O: μάρτυρας νερού.

qPCR στο όργανο SmartCycler

Σημείωση: Εκτελέστε όλα βήματα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 14 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τον ίδιο εκκινητή και μείγμα ανιχνευτών (είτε PPC-ABL είτε PPF-mbcr). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 14. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 14+1 αντιδράσεις (μl)	BCR-ABL mbcr: 16+1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών, 25x	1	15	17	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6,5	97,5	110,5	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	25 έκαστο	–

3. Χορηγήστε 20 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά φρεάτιο.
4. Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά **EAC**», σελίδα 13) στο αντίστοιχο σωληνάριο (συνολικός όγκος 25 μl).
5. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
6. Φορτώστε τα δείγματα στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
7. Προγραμματίστε το όργανο SmartCycler με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Προφίλ θερμοκρασίας

Διατήρηση	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 15 δευτερόλεπτα 60°C για 1 λεπτό με λήψη: Μονό

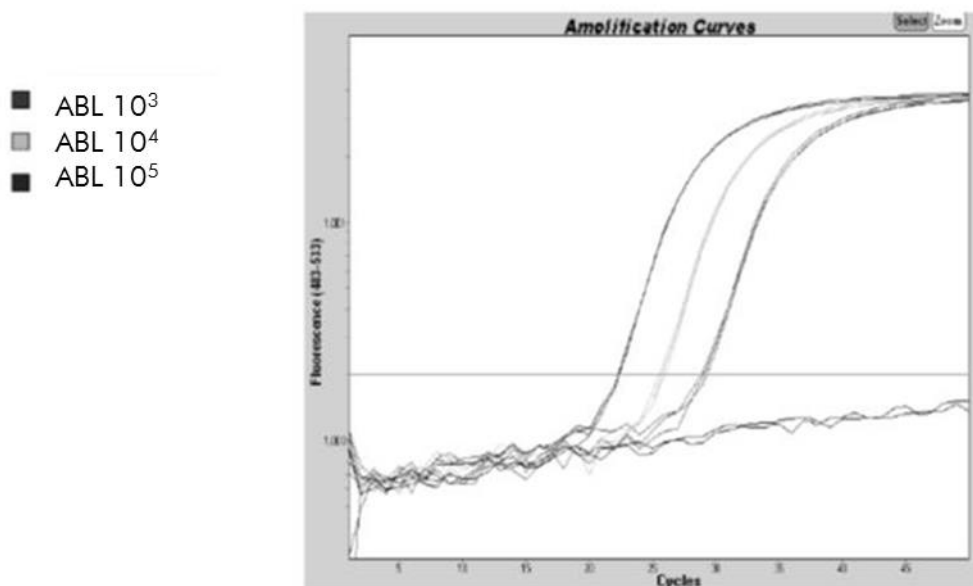
8. Συνιστούμε ένα κατώφλι ρυθμισμένο στο 30. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 15.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Αρχή της ανάλυσης δεδομένων

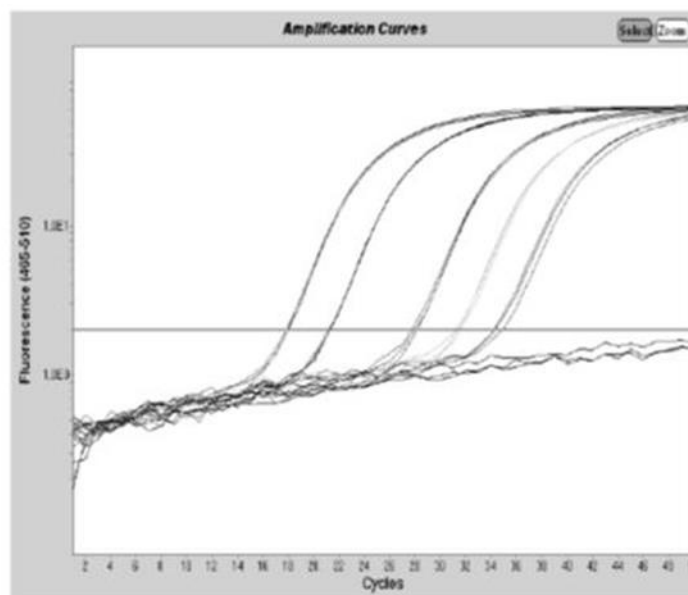
Χρησιμοποιώντας τεχνολογία TaqMan, ο αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για την ανίχνευση ενός σήματος πάνω από το κατώφλι ονομάζεται κύκλος κατωφλίου (C_T) και είναι ευθέως ανάλογος προς την ποσότητα του στόχου που είναι παρών κατά την έναρξη της αντίδρασης.

Χρησιμοποιώντας πρότυπα με γνωστό αριθμό μορίων, είναι δυνατή η δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης και ο καθορισμός της ακριβούς ποσότητας του στόχου που είναι παρών στο εξεταζόμενο δείγμα. Οι πρότυπες καμπύλες *ipsogen* βασίζονται σε πλασμίδια. Χρησιμοποιούμε 3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα πλασμιδίου για CG (γονίδιο-μάρτυρα), και 5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα για FG (γονίδιο σύντηξης), προκειμένου να διασφαλίσουμε ακριβείς πρότυπες καμπύλες. Οι εικόνες 7 και 8 δείχνουν ένα παράδειγμα των καμπυλών ενίσχυσης TaqMan που λαμβάνονται με το kit *ipsogen* BCR-ABL mbcf.



Εικόνα 7. Ανίχνευση προτύπων ABL (C1, C2, C3). 10^3 , 10^4 και 10^5 αντίγραφα/5 μ l.

- m-bcr 10^1
- m-bcr 10^2
- m-bcr 10^3
- m-bcr 10^5
- m-bcr 10^6



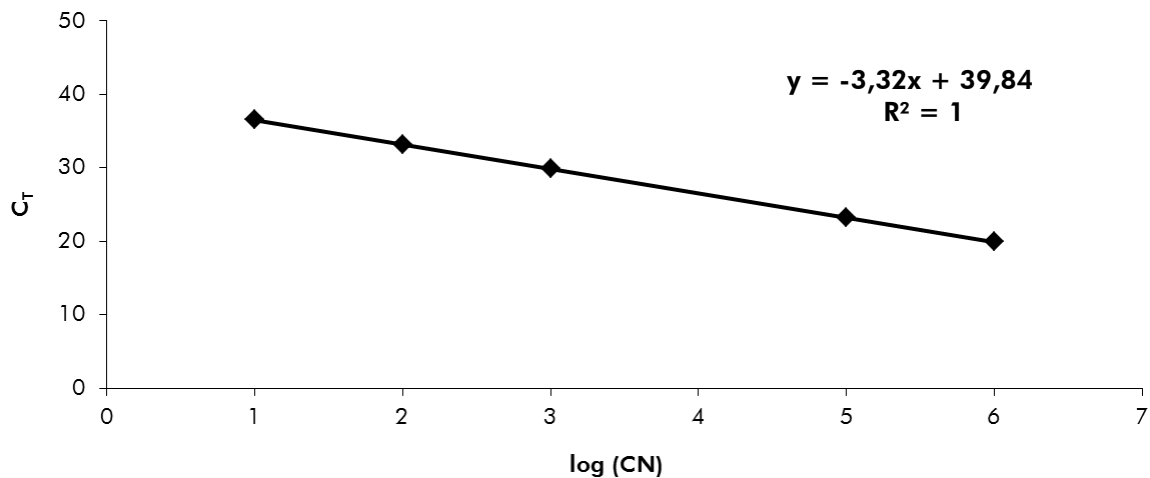
Εικόνα 8. Ανίχνευση προτύπων BCR-ABL mbcr (F1–F5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 αντίγραφα/5 μ l.

Αποτελέσματα

Πρότυπη καμπύλη και κριτήρια ποιότητας

Ανεπεξέργαστα δεδομένα μπορούν να επικολληθούν σε ένα αρχείο Excel[®] για ανάλυση.

Για κάθε γονίδιο (ABL και BCR-ABL), ανεπεξέργαστες τιμές C_T που λαμβάνονται από πρότυπα αραιωμένα διαλύματα πλασμιδίου σχεδιάζονται σύμφωνα με τον αριθμό αντιγράφου log (3, 4 και 5 για C1, C2 και C3, και 1, 2, 3, 5 και 6 για F1, F2, F3, F4 και F5). Η Εικόνα 9 δείχνει ένα παράδειγμα της θεωρητικής καμπύλης που υπολογίζεται σε 5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα.



Εικόνα 9. Θεωρητική καμπύλη υπολογιζόμενη σε 5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα. Μια καμπύλη γραμμικής παλινδρόμησης ($y = ax + b$) υπολογίζεται για κάθε γονίδιο (ABL και BCR-ABL), όπου a είναι η κλίση της γραμμής και b είναι η τομή y , η οποία είναι η συντεταγμένη y του σημείου όπου η γραμμή τέμνει τον άξονα y . Η εξίσωσή της και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) αναγράφονται στο γράφημα.

Καθώς τα πρότυπα είναι δεκαπλάσιες αραιώσεις, η θεωρητική κλίση της καμπύλης είναι $-3,3$. Μια κλίση μεταξύ $-3,0$ και $-3,9$ είναι αποδεκτή εφόσον R^2 είναι $>0,95$ (2). Ωστόσο, μια τιμή για $R^2 >0,98$ είναι επιθυμητή για ακριβή αποτελέσματα (3).

Κανονικοποιημένος αριθμός αντιγράφων (NCN)

Η εξίσωση πρότυπης καμπύλης ABL πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή ανεπεξέργαστων τιμών C_T (που λαμβάνονται με PPC-ABL) για τα άγνωστα δείγματα σε αριθμούς αντιγράφων ABL (ABL_{CN}).

Η εξίσωση πρότυπης καμπύλης BCR-ABL πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή ανεπεξέργαστων τιμών C_T (που λαμβάνονται με PPF-mbcr) για τα άγνωστα δείγματα σε αριθμούς αντιγράφων BCR-ABL ($BCR-ABL_{mbcr_{CN}}$).

Η αναλογία αυτών των τιμών CN δίνει τον κανονικοποιημένο αριθμό αντιγράφων (NCN):

$$NCN = \frac{BCR-ABL_{mbcr_{CN}}}{ABL_{CN}} \times 100$$

Τιμή MRD

Η τιμή ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD) είναι η αναλογία μεταξύ της CG-κανονικοποιημένης έκφρασης του FG κατά την παρακολούθηση $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$ και των διαγνωστικών δειγμάτων $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$.

$$\text{Τιμή MRD (MRDv)} = \frac{(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}}{(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}}$$

Ευαισθησία

Η ευαισθησία (SENS_v) υπολογίζεται σύμφωνα με τη σχετική έκφραση του FG κατά τη διάγνωση (FG_{CN}/CG_{CN})_{DX} και την έκφραση CG (CG_{CN,FUP}) στο δείγμα παρακολούθησης.

$$\text{Ευαισθησία (SENSv)} = \frac{CG_{CN,DX}}{CG_{CN,FUP} \times FG_{CN,DX}}$$

Έλεγχος ποιότητας στις τιμές ABL

Κακή ποιότητα του RNA ή προβλήματα κατά τη διάρκεια των βημάτων qPCR οδηγούν σε χαμηλό ABL_{CN}. Συνιστούμε την απόρριψη των αποτελεσμάτων από δείγματα που δίνουν ABL_{CN} <1.318 (τιμή χαμηλότερη από το 95% CI από δείγματα ασθενών στη μελέτη EAC, παραπομπή 4).

Αναπαραγωγιμότητα μεταξύ θυγατρικών κλώνων

Η διακύμανση στις τιμές C_T μεταξύ των θυγατρικών κλώνων πρέπει να είναι <2, που αντιστοιχεί σε μια τετραπλάσια μεταβολή στις τιμές αριθμού αντιγράφων.

Η διακύμανση στις τιμές C_T μεταξύ των θυγατρικών κλώνων είναι γενικά <1,5 εάν η μέση τιμή C_T των θυγατρικών κλώνων είναι <36 (2).

Σημείωση: Κάθε χρήστης πρέπει να μετρά τη δική του επαναληψιμότητα στο εργαστήριό του.

Μάρτυρες νερού

Οι αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να δίνουν μηδενικό CN.

Ένας θετικός μάρτυρας νερού προκύπτει από διασταυρούμενη μόλυνση. Βλ. «Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων», παρακάτω, για να βρείτε μια λύση.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση οποιωνδήποτε προβλημάτων που ενδεχομένως προκύψουν. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη σελίδα Frequently Asked Questions (συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου Τεχνικής Υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες των Τεχνικών Υπηρεσιών της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι/-ες να απαντήσουν σε οποιοσδήποτε απορίες σας σχετικά με τις πληροφορίες και το πρωτόκολλο αυτού του εγχειριδίου ή τεχνολογίες δειγμάτων και προσδιορισμών (για πληροφορίες επικοινωνίας, βλ. «Πληροφορίες επικοινωνίας», σελίδα 47).

Σχόλια και προτάσεις

Αρνητικό αποτέλεσμα για το γονίδιο-μάρτυρα (ABL) και το BCR-ABL mbcf σε όλα τα δείγματα — το πρότυπο είναι εντάξει

- α) Κακή ποιότητα RNA Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (υψηλός θετικός μάρτυρας στο kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcf Controls, αρ. καταλόγου 670091) παράλληλα.
- β) Αποτυχία βήματος ανάστροφης μεταγραφής Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcf Controls, αρ. καταλόγου 670091) παράλληλα.

Αρνητικό αποτέλεσμα για το γονίδιο-μάρτυρα (ABL) στα δείγματα — το πρότυπο είναι εντάξει

- α) Κακή ποιότητα RNA Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcf Controls, αρ. καταλόγου 670091) παράλληλα.
- β) Αποτυχία βήματος ανάστροφης μεταγραφής Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcf Controls, αρ. καταλόγου 670091) παράλληλα.

Αρνητικό σήμα προτύπου

- α) Σφάλμα διανομής με πιπέτα Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.
Επαναλάβετε την εκτέλεση PCR.
- β) Ακατάλληλη φύλαξη των συστατικών του kit Φυλάσσετε το kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcf στους -15 έως -30°C και διατηρείτε τους εκκινητές και τα μείγματα ανιχνευτών (PPC και PPF) προστατευμένα από το φως. Βλ. «Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων», σελίδα 11.
Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη.
Φυλάσσετε τα αντιδραστήρια σε κλάσματα.

Σχόλια και προτάσεις

Οι αρνητικοί μάρτυρες είναι θετικοί

Διασταυρούμενη μόλυνση

Αντικαταστήστε όλα τα κρίσιμα αντιδραστήρια.

Επαναλάβετε το πείραμα με νέα κλάσματα όλων των αντιδραστηρίων.

Πάντοτε να χειρίζεστε τα δείγματα, τα συστατικά του kit και τα αναλώσιμα σύμφωνα με τις κοινώς αποδεκτές πρακτικές προκειμένου να αποφύγετε επιμόλυνση από μεταφορά.

Απουσία σήματος, ακόμα και στους πρότυπους μάρτυρες

a) Σφάλμα διανομής με πιπέτα ή παράλειψη αντιδραστηρίων

Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.

Επαναλάβετε την εκτέλεση PCR.

b) Ανασταλτικές επιδράσεις του υλικού του δείγματος, προκαλούμενες από ανεπαρκή καθαρισμό

Επαναλάβετε την προετοιμασία RNA.

c) LightCycler: Επιλέχθηκε λανθασμένο κανάλι ανίχνευσης

Ορίστε τη ρύθμιση καναλιού σε F1/F2 ή 530 nm/640 nm.

d) LightCycler: Δεν προγραμματίστηκε λήψη δεδομένων

Ελέγξτε τα προγράμματα κύκλων.

Επιλέξτε τη λειτουργία λήψης «Single» (μονό) στο τέλος κάθε τμήματος ανασύνδεσης του προγράμματος PCR.

Σχόλια και προτάσεις

Απουσία σήματος ή χαμηλό σήμα στα δείγματα αλλά οι πρότυποι μάρτυρες είναι εντάξει

- α) Κακή ποιότητα RNA ή χαμηλή συγκέντρωση
- Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls, αρ. καταλόγου 670091) παράλληλα.
- β) Αποτυχία βήματος ανάστροφης μεταγραφής
- Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls, αρ. καταλόγου 670091) παράλληλα.

Η ένταση του φθορισμού είναι πολύ χαμηλή

- α) Ακατάλληλη φύλαξη των συστατικών του κιτ
- Φυλάσσετε το κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr στους -15 έως -30°C και διατηρείτε τους εκκινητές και τα μείγματα ανιχνευτών (PPC και PPF) προστατευμένα από το φως. Βλ. «Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων», σελίδα 11.
Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη.
Φυλάσσετε τα αντιδραστήρια σε κλάσματα.
- β) Πολύ χαμηλή αρχική ποσότητα RNA-στόχου
- Αυξήστε την ποσότητα του RNA δείγματος.
Σημείωση: Ανάλογα με την επιλεγμένη μέθοδο προετοιμασίας RNA, ενδέχεται να υπάρξουν ανασταλτικές επιδράσεις.

LightCycler: Η ένταση φθορισμού ποικίλλει

- α) Σφάλμα διανομής με πιπέτα
- Η διακύμανση που προκαλείται από το επονομαζόμενο «σφάλμα διανομής με πιπέτα» μπορεί να μειωθεί αναλύοντας τα δεδομένα στη λειτουργία F1/F2 ή 530 nm/640 nm.
- β) Ανεπαρκής φυγοκέντρηση των τριχοειδών
- Το προετοιμασμένο μείγμα PCR μπορεί ακόμα να βρίσκεται στο επάνω δοχείο του τριχοειδούς, ή φυσαλίδα αέρα εγκλωβισμένη στο άκρο του τριχοειδούς.
Πάντοτε να φυγοκεντρίζετε τα τριχοειδή φορτωμένα με το μείγμα της αντίδρασης, όπως περιγράφεται στο ειδικό εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής.

Σχόλια και προτάσεις

- c) Η εξωτερική επιφάνεια του άκρου του τριχοειδούς είναι βρώμικη Πάντοτε να φοράτε γάντια όταν χειρίζεστε τα τριχοειδή.

LightCycler: Σφάλμα της πρότυπης καμπύλης

- Σφάλμα διανομής με πιπέτα Η διακύμανση που προκαλείται από το επανομαζόμενο «σφάλμα διανομής με πιπέτα» μπορεί να μειωθεί αναλύοντας τα δεδομένα στη λειτουργία F1/F2 ή 530 nm/640 nm.

Ποιοτικός έλεγχος

Ποιοτικός έλεγχος ολόκληρου του κιτ διενεργήθηκε σε ένα όργανο LightCycler 480. Αυτό το κιτ παράγεται σύμφωνα με το πρότυπο ISO 13485:2003. Πιστοποιητικά ανάλυσης είναι διαθέσιμα κατόπιν αιτήματος στο www.qiagen.com/support/.

Περιορισμοί

Οι χρήστες πρέπει να έχουν εκπαιδευτεί και εξοικειωθεί με την τεχνολογία πριν από τη χρήση αυτής της συσκευής.

Κάθε παραγόμενο διαγνωστικό αποτέλεσμα θα πρέπει να ερμηνεύεται στο πλαίσιο των υπόλοιπων κλινικών ή εργαστηριακών ευρημάτων. Η επαλήθευση της απόδοσης του συστήματος για οποιοσδήποτε διαδικασίες που εφαρμόζονται στο εκάστοτε εργαστήριο και δεν καλύπτονται από τις μελέτες αξιολόγησης απόδοσης της QIAGEN αποτελούν ευθύνη του χρήστη.

Δώστε προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης τους.

Σημείωση: Το κιτ έχει σχεδιαστεί σύμφωνα με τις μελέτες «Europe Against Cancer» (Η Ευρώπη κατά του καρκίνου, EAC) (4), και συμμορφώνεται με τις ενημερωμένες διεθνείς συστάσεις (3, 5). Πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στο παρόν εγχειρίδιο, σε συνδυασμό με επικυρωμένα αντιδραστήρια και όργανα (βλ. «Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται», σελίδα 9). Οποιαδήποτε μη προβλεπόμενη χρήση αυτού του προϊόντος ή/και τροποποίηση των συστατικών θα επισύρει ακύρωση της ευθύνης της QIAGEN.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Μη κλινικές μελέτες

Υλικά και μέθοδοι

Η αξιολόγηση της απόδοσης διενεργήθηκε σε ένα ABI PRISM 7700 SDS, σε συνδυασμό με αντιδραστήρια που παρατίθενται στην ενότητα «Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται», σελίδα 9. Μελέτες ισοδυναμίας επικύρωσαν τη χρήση του στα ακόλουθα όργανα: ABI PRISM 7000 και 7900HT SDS, όργανα LightCycler 1.2 και 480, Rotor

Μη κλινικές μελέτες διενεργήθηκαν για τον καθορισμό της αναλυτικής απόδοσης του kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcf. Αυτές οι μη κλινικές εργαστηριακές μελέτες διενεργήθηκαν σε ολικό RNA από την TOM1 κυτταρική σειρά αραιωμένο σε μια σταθερή τελική ποσότητα ολικού RNA MV4-11 κυτταρικής σειράς.

Για τον καθορισμό της επαναληψιμότητας του προσδιορισμού, 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις του TOM1 ολικού RNA (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg και 0,5 pg) αραιωμένες σε MV4-11 ολικό RNA, σε σταθερό τελικό συνολικό όγκο 1.000 ng, αναλύθηκαν σε 5 θυγατρικούς κλώνους ανά εκτέλεση και σε 4 διαφορετικές εκτελέσεις (Εικόνα 10).

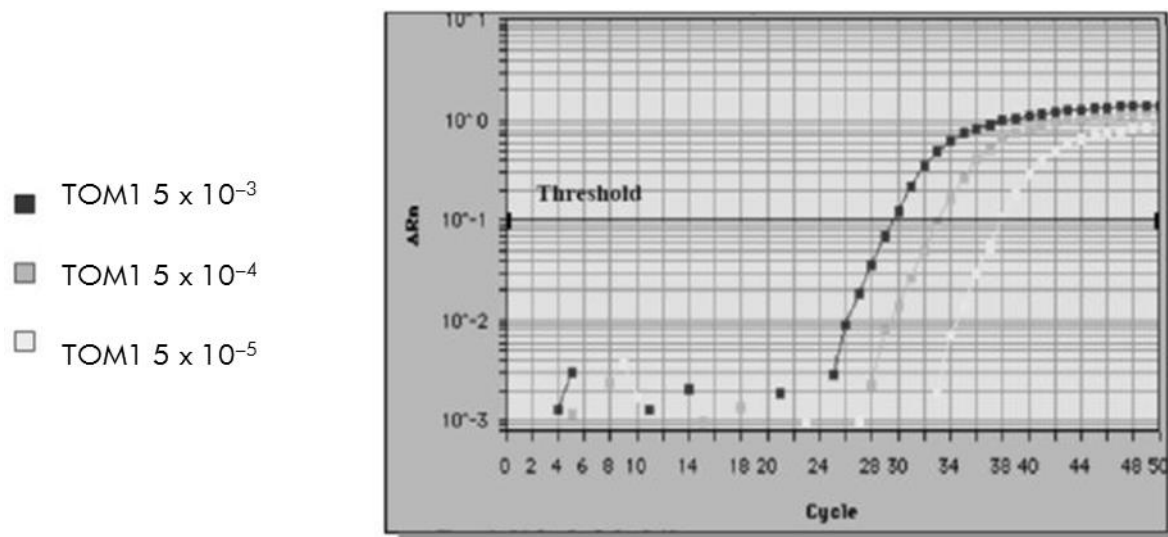


Figure 10. Διαγράμματα ενίσχυσης αραιώσεων 5×10^{-3} (5 ng), 5×10^{-4} (0,5 ng) και 5×10^{-5} (0,05 ng) TOM1 ολικού RNA σε MV4-11 αρνητικό ολικό RNA.

Αναλυτικά δεδομένα

Οι Πίνακες 16–19 δείχνουν τις αναλύσεις μεταξύ προσδιορισμών με το μέσο κύκλο κατωφλίου (C_T), τυπική απόκλιση (TA), αριθμό δειγμάτων (n), συντελεστή διακύμανσης (ΣΔ), μέσο αριθμό αντιγράφων (CN), και μέσο κανονικοποιημένο αριθμό αντιγράφων (NCN).

Πίνακας 16. Ανάλυση μεταξύ προσδιορισμών — mbcr και ABL κυτταρικών σειρών

Κυτταρική σειρά	Αραίωση	Μέση C _T	TA	n	ΣΔ (%)
mbcr	5 x 10 ⁻³ (5 ng/1 μg)	29,19	0,26	20	0,88
	5 x 10 ⁻⁴ (0,5 ng/1 μg)	33,70	0,48	20	1,47
	5 x 10 ⁻⁵ (0,05 ng/1 μg)	37,03	1,16	20	3,15
ABL	–	25,01	0,87	100	3,46

Πίνακας 17. Ανάλυση μεταξύ προσδιορισμών — πλασμίδια

Γονίδιο	Πλασμίδιο	Μέση C _T	TA	n	ΣΔ (%)
mbcr	F1 (10 ¹ αντίγραφα)	35,19	0,90	11	2,57
	F2 (10 ² αντίγραφα)	31,87	0,64	12	1,99
	F3 (10 ³ αντίγραφα)	28,41	0,71	12	2,50
	F4 (10 ⁵ αντίγραφα)	21,48	0,59	12	2,76
	F5 (10 ⁶ αντίγραφα)	18,37	0,71	12	3,89
ABL	C1 (10 ³ αντίγραφα)	29,68	0,85	12	2,86
	C2 (10 ⁴ αντίγραφα)	26,01	0,51	12	1,96
	C3 (10 ⁵ αντίγραφα)	22,53	0,42	12	1,86

Πίνακας 18. Ανάλυση μεταξύ προσδιορισμών — BCR-ABL mbcr και ABL κυτταρικών σειρών (μέσος CN)

Κυτταρική σειρά	Αραίωση	Μέσος CN	TA	n	ΣΔ (%)
BCR-ABL mbcr	5 x 10 ⁻³ (5 ng/1 μg)	587,30	194,10	20	33,05
	5 x 10 ⁻⁴ (0,5 ng/1 μg)	57,84	20,38	20	35,23
	5 x 10 ⁻⁵ (0,05 ng/1 μg)	4,39	2,73	20	62,35
ABL	–	22.038,22	9.459,17	100	42,92

Πίνακας 19. Ανάλυση μεταξύ προσδιορισμών — BCR-ABL mbcr κυτταρικής σειράς (μέσος NCN)

Κυτταρική σειρά	Αραίωση	Μέσος NCN*	TA	n	ΣΔ (%)
BCR-ABL mbcr	5×10^{-3} (5 ng/1 μg)	267,46	93,22	20	34,85
	5×10^{-4} (0,5 ng/1 μg)	23,54	7,36	20	31,28
	5×10^{-5} (0,05 ng/1 μg)	2,60	2,80	20	107,66

* Για αυτά τα αποτελέσματα μελέτης μόνο, ο NCN δίνεται ως $\frac{\text{BCR-ABL mbcr}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10.000$.

Κλινικές μελέτες

Η αξιολόγηση της απόδοσης διενεργήθηκε σε ένα ABI PRISM 7700 SDS, σε συνδυασμό με αντιδραστήρια που παρατίθενται στην ενότητα «Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται», σελίδα 9. Μελέτες ισοδυναμίας επικύρωσαν τη χρήση του στα ακόλουθα όργανα: ABI PRISM 7000 και 7900HT SDS, όργανα LightCycler 1.2 και 480, Rotor

Μια ομάδα 26 εργαστηρίων, σε 10 Ευρωπαϊκές χώρες, οργανωμένα σε μια συντονισμένη δράση του Europe Against Cancer (EAC), χρησιμοποίησαν πλασμίδια παρεχόμενα από την IPSOGEN για να καθορίσουν ένα τυποποιημένο πρωτόκολλο για την ανάλυση qPCR των κύριων σχετιζόμενων με τη λευχαιμία γονιδίων σύντηξης στο κλινικό περιβάλλον. Το μεταγράφημα BCR-ABL p190 ήταν ένα από τα γονίδια σύντηξης (FG) που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Παρουσιάζουμε εδώ μια σύνοψη αυτής της μελέτης επικύρωσης. Τα πλήρη αποτελέσματα έχουν δημοσιευθούν το 2003 (4, 7).

Επαναληψιμότητα μεταξύ εργαστηρίων για τα πρότυπα πλασμιδίων CG και FG

Ένδεκα εργαστήρια πραγματοποίησαν ένα πείραμα επαναληψιμότητας μεταξύ εργαστηρίων για την αξιολόγηση της διακύμανσης στη μέτρηση των πρότυπων αραιωμένων διαλυμάτων πλασμιδίων CG και FG. Τα αραιωμένα διαλύματα εκτελέστηκαν εις διπλούν σε κάθε εγκατάσταση. Ο Πίνακας 20 αναφέρει τη μέση τιμή, την τυπική απόκλιση και τον ΣΔ (%) για κάθε αραιωμένο διάλυμα.

Πίνακας 20. Επαναληψιμότητα μεταξύ εργαστηρίων για τα πρότυπα πλασμιδίων CG και FG

Γονίδιο	Αραίωση	Μέσος όρος	C _T TA	ΣΔ (%)
Γονίδιο-μάρτυρας ABL	C1	29,04	0,53	1,82
	C2	25,64	0,47	1,84
	C3	22,10	0,34	1,55
Γονίδιο σύντηξης BCR-ABL mbc _r	F1	35,99	1,18	3,28
	F2	32,05	0,74	2,32
	F3	28,43	0,65	2,29
	F4	21,60	0,59	2,72
	F5	18,24	0,46	2,57

Τιμές έκφρασης του μεταγραφήματος BCR-ABL mbc_r FG

Οι Πίνακες 21 και 22 δείχνουν τις τιμές έκφρασης μεταγραφήματος BCR-ABL mbc_r FG και ABL CG, για την TOM1 κυτταρική σειρά, σε ασθενείς με ΟΛΛ κατά τη διάγνωση και φυσιολογικούς ασθενείς.

Πίνακας 21. Τιμές έκφρασης μεταγραφήματος BCR-ABL mbc_r FG και ABL CG — Τιμές C_T

	Τιμές C _T (95% εύρος)	
	BCR-ABL mbc _r	ABL
TOM1 κυτταρική σειρά	22,8	21,8
Δείγματα ασθενών με ΟΛΛ		
MO (n = 17)	24,7 (21,3–27,1)	24,5 (21,7–27,1)
ΠΑ (n = 7)	23,3 (21,7–29,1)	22,5 (21,0–27,0)
Αρνητικά δείγματα ασθενών		
MO (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
ΠΑ (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

Πίνακας 22. Τιμές έκφρασης μεταγραφήματος BCR-ABL mbcf FG και ABL CG — Τιμές CN και NCN

	Τιμές CN (95% εύρος)		Τιμές NCN (95% εύρος)
	BCR-ABL mbcf	ABL	CN BCR-ABL mbcf/CN ABL
Δείγματα ασθενών με ΟΛΛ			
ΜΟ (n = 17)	9.550 (1.738–97.724)	11.912 (5.012–70.795)	0,8 (0,35–1,38)
ΠΑ (n = 7)	91.201 (1.905–208.930)	134.896 (4.786–114.815)	0,68 (0,4–1,82)
Αρνητικά δείγματα ασθενών			
ΜΟ (n = 26)	–	19.201 (12.922–25.480)	–
ΠΑ (n = 74)	–	21.136 (17.834–24.437)	–

Οι τιμές ABL C_T δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των φυσιολογικών και των λευχαιμικών δειγμάτων, ούτε μεταξύ των τύπων δειγμάτων (ΠΑ ή ΜΟ) ή των λευχαιμικών δειγμάτων (ΟΛΛ, ΑΜΛ, ΧΜΛ).

Ποσοστά ψευδών θετικών και ψευδών αρνητικών

Τα ποσοστά των ψευδών θετικών και ψευδών αρνητικών υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους μάρτυρες.

- Θετικοί μάρτυρες: TOM1 κύτταρα, μια κυτταρική σειρά γνωστή για τη θετικότητά της για το γονίδιο σύντηξης BCR-ABL p190. Δείγματα ασθενών ήδη αξιολογημένα για θετικότητα σε p190
- Αρνητικοί μάρτυρες: Αρνητικά δείγματα RNA, μάρτυρες μη ενίσχυσης (NAC) από *E. coli* RNA αντί για ανθρώπινο RNA για τον έλεγχο για επιμόλυνση PCR, και μάρτυρες χωρίς μήτρα (NTC), οι οποίοι περιείχαν νερό αντί για ανθρώπινο RNA

Ενίσχυση στα δείγματα RNA του FG διενεργήθηκε εις τριπλούν, και εις διπλούν για CG.

Ένα ψευδές αρνητικό δείγμα ορίστηκε ως ένα θετικό δείγμα RNA με λιγότερο από 50% των θετικών φρεατίων (0/2, 0/3 ή 1/3).

Ένα ψευδές θετικό δείγμα ορίστηκε ως ένα αρνητικό δείγμα με τουλάχιστον 50% των θετικών φρεατίων (1/2, 2/3 ή 3/3).

Ο Πίνακας 23 δείχνει τον αριθμό και το ποσοστό των ψευδών αρνητικών και ψευδών θετικών δειγμάτων.

Πίνακας 23. Ψευδή αρνητικά και ψευδή θετικά δείγματα

Ψευδής αρνητικότητα		Ψευδής θετικότητα	
10^{-3}	10^{-4}	Αρνητικός μάρτυρας FG	NAC/NTC
0% (0/54)	4% (3/75)	4,8% (6/126)	5,8% (7/120)

Βιβλιογραφία

Η QIAGEN διατηρεί μία μεγάλη, ενημερωμένη online βάση δεδομένων επιστημονικών δημοσιεύσεων στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα της QIAGEN. Με τις εύχρηστες δυνατότητες αναζήτησης μπορείτε να βρείτε τα άρθρα που αναζητάτε – είτε με απλή αναζήτηση λέξης-κλειδιού ή ορίζοντας την εφαρμογή, τον ερευνητικό τομέα, τον τίτλο κτλ.

Για ένα πλήρη κατάλογο της βιβλιογραφίας, επισκεφθείτε την online βιβλιογραφική βάση δεδομένων της QIAGEN (Reference Database) στη διεύθυνση www.qiagen.com/RefDB/search.asp ή επικοινωνήστε με τις τεχνικές υπηρεσίες της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Παρατιθέμενη βιβλιογραφία

1. Thomas, D.A. (2007) Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukemia: a new era of challenges. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2007**, 435.
2. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
3. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.
4. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.
5. Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* **108**, 28.

6. Silvy, M., Mancini, J., Thirion, X., Sigaux, F., and Gabert, J. (2005) Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. *Leukemia* **19**, 305.
7. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.

Σύμβολα

Τα ακόλουθα σύμβολα μπορεί να εμφανίζονται στη συσκευασία και στην επισήμανση:



Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις



Ημερομηνία λήξης



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



Αριθμός υλικού



Διεθνής κωδικός μονάδας εμπορίας



Περιορισμός θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης

Πληροφορίες επικοινωνίας

Για θέματα τεχνικής υποστήριξης και περαιτέρω πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στη διεύθυνση www.qiagen.com/Support, καλέστε 00800-22-44-6000 ή επικοινωνήστε με κάποιο από το Τμήματα

Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους (βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε τη διεύθυνση www.qiagen.com).

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbcf Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις: Πρότυπα γονιδίου-μάρτυρα ABL, πρότυπα γονιδίου σύντηξης BCR-ABL mbcf, εκκινητής και μείγμα ανιχνευτών ABL, εκκινητής και μείγμα ανιχνευτών γονιδίου σύντηξης BCR-ABL mbcf	670023
Rotor-Gene Q MDx — για επικυρωμένη για IVD ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου σε κλινικές εφαρμογές		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνει εγκατάσταση και κατάρτιση	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002033
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbcf Controls Kit — για ποσοτική επικύρωση της εκχύλισης RNA και της ανάστροφης μεταγραφής του γονιδίου σύντηξης BCR-ABL mbcf		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbcf Controls Kit	Κυτταρικές σειρές με αρνητική, υψηλή και χαμηλή θετική έκφραση του γονιδίου σύντηξης BCR-ABL mbcf	670091

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του kit QIAGEN. Τα εγχειρίδια και οι οδηγίες χρήσης των kit QIAGEN είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση www.qiagen.com. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από τις τεχνικές υπηρεσίες της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Αυτό το προϊόν προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση. Τα προϊόντα *ipsogen* δεν επιτρέπεται να μεταπωληθούν, να τροποποιηθούν για μεταπώληση ή να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή εμπορικών προϊόντων χωρίς την έγγραφη έγκριση της QIAGEN.

Οι πληροφορίες στο παρόν έγγραφο μπορεί να αλλάξουν χωρίς προειδοποίηση. Η QIAGEN δεν αναλαμβάνει καμία ευθύνη για τυχόν σφάλματα που μπορεί να περιέχονται σε αυτό το έγγραφο. Αυτό το έγγραφο θεωρείται ότι είναι πλήρες και ακριβές κατά το χρόνο της δημοσίευσής. Σε καμία περίπτωση η QIAGEN δεν ευθύνεται για τυχαιές, ειδικές, πολλαπλές ή επακόλουθες ζημιές σε σχέση με, ή που προκύπτουν από τη χρήση αυτού του εγγράφου.

Τα προϊόντα *ipsogen* είναι εγγυημένα ότι πληρούν τις δηλωμένες προδιαγραφές τους. Η αποκλειστική υποχρέωση της QIAGEN και η αποκλειστική αποκατάσταση του πελάτη περιορίζονται στην αντικατάσταση των προϊόντων δωρεάν σε περίπτωση που η απόδοση των προϊόντων αυτών δεν είναι η προβλεπόμενη.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, *ipsogen*®, Rotor-Gene® (Όμιλος QIAGEN). ABI PRISM®, FAM™, RNaseOUT™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™ (Life Technologies Corporation). Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.). Excel® (Microsoft Corporation). LightCycler®, TaqMan® (Όμιλος Roche). SmartCycler® (Cepheid).

Άδεια περιορισμένης χρήσης

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr των εξής όρων:

1. Η χρήση του kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο kit ipsogen BCR-ABL1 mbcr* και μόνο μαζί με τα συστατικά που περιέχει το kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το kit, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στο *Εγχειρίδιο kit ipsogen BCR-ABL1 mbcr* και πρόσθετα πρωτόκολλα στη διεύθυνση www.qiagen.com.
2. Με την εξαίρεση των ρητά αναφερόμενων αδειών, η QIAGEN δεν παρέχει καμία εγγύηση πως αυτό το kit και/ή η χρήση/-εις του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα συστατικά του φέρουν άδεια χρήσης για μια μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επανάχρηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή του.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά οποιοσδήποτε άλλες άδειες, ρητές ή έμμεσες εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής ή ο χρήστης του kit συμφωνεί να μην προβεί και να μην επιτρέψει σε κανέναν άλλο να προβεί σε οποιοσδήποτε ενέργειες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν οποιοσδήποτε πράξεις που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοσδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το kit και/ή τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. www.qiagen.com.

HB-1357-002 © 2013–2015, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

